



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01R 33/46, G01N 24/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/18911 (43) Date de publication internationale: 20 juin 1996 (20.06.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01660 (22) Date de dépôt international: 13 décembre 1995 (13.12.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/15195 16 décembre 1994 (16.12.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CONSEIL INTERPROFESSIONNEL DU VIN DE BORDEAUX [FR/FR]; 1, cours du XXX-Juillet, F-33075 Bordeaux Cédex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VERCAUTEREN, Joseph [FR/FR]; 37, avenue Marc-Desbats, F-33600 Pessac (FR). FORVEILLE, Laurence [FR/FR]; 2 Résidence Raymond-Bonnot, 4, rue Rostand, F-33660 Saint-Seurin-sur-l'Isle (FR). RUTLEDGE, Douglas [FR/FR]; 51, rue des Vinaigriers, F-75010 Paris (FR). (74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING PLANT SPECIES AND HYBRIDS THEREOF (54) Titre: PROCEDE D'IDENTIFICATION D'ESPECES VEGETALES ET DE LEURS HYBRIDES (57) Abstract A method wherein a polyphenol compound extract from a plant material of a plant species, a hybrid thereof or lower-order taxons thereof, or from a product produced from said material, is analysed by multidimensional NMR, whereafter quantitative signal analysis and statistical integration data processing are performed to give data characterising the plant species, the hybrid and the lower-order taxons. The method is useful for identifying a plant species and hybrids or lower-order taxons thereof in order to determine their origin. (57) Abrégé Selon le procédé de l'invention, on soumet un extrait de composés polyphénoliques, provenant d'un matériau végétal d'une espèce végétale ou de l'un de ses hybrides ou de leurs taxons de rang inférieur, ou d'un produit élaboré à partir de ce matériau, à au moins une analyse par RMN multidimensionnelle, suivie d'une analyse quantitative des signaux et du traitement statistique des données d'intégration, conduisant à l'obtention de données caractéristiques de l'espèce végétale, de l'hybride et des taxons de rang inférieur. Application à l'identification d'une espèce végétale de ses hybrides ou taxons de rang inférieur et utilisation à des fins de contrôle de leur origine.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDURE D'IDENTIFICATION D'ESPECES

5

VEGETALES ET DE LEURS HYBRIDES

L'invention a pour objet un procédé d'identification d'espèces végétales et de leurs hybrides, et des taxons de rang inférieur, basé sur l'utilisation d'un référentiel.

Par taxons de rang inférieur, on entend en particulier sous-espèces, variétés, sous-variétés, formes et sous-formes, ainsi que cultivars ou cépages et clones, sans être lié à des définitions strictes de ceux-ci.

En prenant comme exemple Vitis vinifera, V. labrusca, V. riparia ou V. rupestris qui sont des vignes comme espèce végétale, il est couramment considéré que Vitis correspond au genre, vinifera, riparia, labrusca, ou rupestris correspondent à l'espèce, que ces espèces comprennent plusieurs cultivars ou cépages, parmi lesquels divers clones.

Les expressions "espèces végétales" et "hybrides", telles qu'utilisées dans la description et les revendications englobent, sauf indications contraires, les taxons de rang inférieur qu'elles renferment.

Dans le domaine de la vigne par exemple, de nombreuses recherches sont effectuées pour mettre au point des méthodes de reconnaissance de cépages et, parmi ceux-ci, de clones, permettant aux services de contrôle de s'assurer qu'un pied de vigne, voire une bouteille de vin, correspond bien aux indications données. Leur reconnaissance par la seule observation ampélographique est difficile et rend nécessaire le recours à des méthodes de laboratoire.

Des techniques de séparation par chromatographie ont ainsi été proposées. Toutefois, elles ne permettent pas une analyse globale et reproductible des produits, une partie des tanins étant retenue sur la
5 colonne. De plus, ces techniques ne permettent pas de différencier les clones entre eux.

On a également rapporté l'utilisation de la RMN ou des techniques de génie génétique.

Cependant, les travaux décrits, en ce qui
10 concerne la RMN, portent essentiellement sur les vins et non sur les organes de la vigne.

Il s'agit plus spécialement d'études sur des produits issus de la fermentation de levures dans des vins blancs, comme le glycérol, ou de produits
15 fermentescibles, comme les sucres, qui ne sont donc pas propres à la vigne.

En ce qui concerne la RMN, il s'agit de techniques monodimensionnelles (^1H et ^{13}C) pour lesquelles les raies spectrales se chevauchent, ce qui
20 induit des erreurs dans les données d'intégration.

Quant aux techniques de génie génétique, elles présentent l'inconvénient d'être difficiles à mettre en oeuvre. De plus, elles nécessitent du personnel hautement qualifié et des équipements de laboratoires répondant à
25 des normes strictes, ce qui ne permet pas d'envisager des applications à l'échelle industrielle, compte tenu des coûts qui en résultent.

La recherche de moyens fiables de caractérisation a conduit les inventeurs à prendre en
30 compte un type de composés présent dans la vigne et de nombreuses autres espèces végétales, et à le soumettre à une succession d'analyses réalisées dans des conditions déterminées.

Les travaux effectués ont ainsi montré que, de manière inattendue, les composés polyphénoliques présentent des constantes qualitatives et quantitatives caractéristiques d'une espèce végétale et de ses hybrides et, à l'intérieur d'une espèce végétale et de ses hybrides, caractéristiques de leurs taxons de rang inférieur comme leurs sous-espèces, variétés, sous-variétés, formes et sous-formes ainsi que cultivars ou cépages et même parmi ceux-ci, des clones.

10 L'invention repose sur l'utilisation de ces composés phénoliques pour obtenir des informations constituant une carte d'identité d'une espèce végétale ou d'un hybride donné et de leurs taxons de rang inférieur.

15 L'invention a donc pour but de fournir un nouveau procédé de reconnaissance d'espèces végétales et de leurs hybrides, de leurs taxons de rang inférieur basé sur l'utilisation d'un référentiel permettant une discrimination de grande fiabilité.

20 L'invention vise ainsi à fournir plus spécialement un système de référence, ou banque de données, pour une espèce végétale, ou ses hybrides et leurs taxons de rang inférieur, élaboré à partir de caractéristiques des composés phénoliques qu'elles renferment.

25 Selon un autre aspect, l'invention vise à fournir des moyens pour vérifier la nature du rang d'un taxon d'une espèce végétale ou d'un hybride à contrôler.

30 Elle vise également des moyens pour contrôler à partir d'un produit issu d'un matériau végétal, l'appartenance de ce dernier à un taxon de rang inférieur d'une espèce végétale ou d'un hybride.

Le procédé, selon l'invention, d'identification d'une espèce végétale, ou de ses hybrides, ou d'un taxon de rang inférieur de cette espèce ou de ses hybrides, est

caractérisé en ce qu'on soumet un extrait essentiellement constitué par des composés polyphénoliques, provenant d'un matériau végétal donné de ladite espèce ou hybride, de leurs taxons de rang inférieur, ou d'un produit élaboré à partir de ces matériaux, à au moins une analyse par RMN multidimensionnelle, suivie d'une analyse quantitative des signaux et du traitement statistique des données d'intégration, conduisant à l'obtention de données caractéristiques de l'espèce végétale, de l'hybride, ou de leurs taxons de rang inférieur.

L'exploitation des données des cartes de RMN obtenues selon l'invention, concernant les extraits polyphénoliques des matériaux et produits étudiés, permet de disposer d'une technique de reconnaissance de grande fiabilité des taxons de rang inférieur auxquels appartiennent ces matériaux, ou à partir desquels sont obtenus ces produits. Cette fiabilité implique la réalisation des extractions et des analyses dans les mêmes conditions.

D'une manière avantageuse, ces données s'avèrent constantes pour un matériau donné, ce qui permet leur utilisation pour élaborer un système de référence ou de banque de données constituant une signature du potentiel génétique des taxons de rang inférieur étudiés.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les extraits polyphénoliques sont soumis à une analyse RMN hétéronucléaire ^1H - ^{13}C , procurant des informations sur la structure des polyphénols présents dans les extraits.

On a plus spécialement recours à une analyse bidimensionnelle (2D).

Au moyen d'une détection protonique, en utilisant d'une manière avantageuse une sonde de

détection dite inversée $1\text{H}-13\text{C}$, donc de grande sensibilité 1H , on établit les corrélations entre le 1H et le 13C (taches de corrélation) par le biais de leur couplage mutuel.

5 De manière avantageuse, on a plus spécialement recours à l'analyse HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), qui établit des corrélations hétéronucléaires $1\text{H}-13\text{C}$ à longue distance. On voit ainsi le couplage entre les protons et les carbones 13 distants
10 de deux ou trois liaisons.

La séquence d'impulsions utilisée est plus spécialement celle d'une HMBC-GAS (Gradient Accelerated Spectroscopy). Des impulsions de gradients de champ magnétique sont envoyées au cours de l'expérience, ce qui
15 permet une suppression satisfaisante des pics centraux, c-à-d horizontalement sur le milieu du spectre ne contenant pas d'informations, et ceci avec un temps d'expérience réduit dans les conditions de la mise en oeuvre du procédé par rapport à l'HMBC sans gradients.

20 De plus, les cartes HMBC-GAS présentent l'avantage d'une plus grande lisibilité. En effet, elles ne contiennent pas de traînées verticales ("1 noise") situées à la fréquence de chaque signal et provenant de l'imperfection du système d'élimination de tels signaux
25 dans le cas de "détection en quadrature" dans les expériences sans gradients.

Les interférogrammes (FID) sont tout d'abord multipliés par une fonction sinusoïdale carrée pour augmenter le rapport signal/bruit (S/B) et subissent une
30 Transformée de Fourier en magnitude.

En variante, ou en plus de l'analyse HMBC-GAS, on soumet l'extrait polyphénolique à une analyse HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation). Cette analyse permet d'étudier les corrélations hétéro-

nucléaires entre les $1H$ et les $13C$ situés à une seule liaison. Les interférogrammes (FID) sont tout d'abord multipliés par une fonction sinusoïdale carrée pour augmenter le rapport S/B, et subissent une Transformée de Fourier, mais dans ce cas-là en amplitude, puis ils sont
5 phasés.

Dans une autre variante, utilisée seule ou en combinaison avec l'analyse HMBC-GAS et/ou HMQC, on soumet l'extrait à étudier à une analyse HMQC-HOHAHA
10 (HOMonuclear HArtman HAhN). Cette analyse permet de voir non seulement le couplage d'un carbone 13 avec le proton qu'il porte directement, mais également avec tous les protons qui sont couplés à ce dernier. Les principaux paramètres expérimentaux correspondent à ceux de l'HMQC
15 auxquels est ajouté un "temps de mélange" (spin-lock).

Pour réaliser ces expériences, il est avantageux d'utiliser un spectromètre équipé d'un système de régulation de la température très stable, afin d'éviter des perturbations sur les cartes de RMN.

20 Les taches de corrélation des analyses RMN sont ensuite intégrées et les données obtenues font l'objet d'une analyse statistique multidimensionnelle.

L'intégration correspond au calcul du volume de chaque pic de corrélation en additionnant tous les points
25 présents dans le secteur délimité autour de chaque tache de corrélation, chaque tache de corrélation étant digitalisée en points d'intensité variable.

L'ensemble des données d'intégration est soumis à une analyse multidimensionnelle.

30 On a ainsi plus spécialement recours à l'analyse de variance (ANOVA), et/ou à l'analyse en composantes principales (ACP), et/ou à l'analyse factorielle discriminante (AFD).

L'ANOVA permet de sélectionner les taches de corrélation (variables) qui apportent le plus d'informations.

5 L'ACP représente les individus (clones) dans un espace à deux dimensions, les individus étant initialement présents dans un espace à N dimensions (N = nombre de variables sélectionnées). Cette analyse permet d'étudier les individus dans l'espace des composantes principales, de manière à pouvoir déterminer l'existence possible de groupes et d'anomalies.

10 L'AFD est utilisée pour discriminer de manière optimale les groupes prédéfinis de clones.

Le recours à l'ANOVA permet de sélectionner les variables les plus riches en informations. On rappelle que cette technique repose sur le calcul d'un facteur F proportionnel au rapport de la variance calculée tous groupes confondus sur la somme des variances calculées à l'intérieur de chaque groupe pré-défini. Dans le cas de la vigne, ces groupes sont les cépages, ou les clones.

15 Les variables pour lesquelles F est le plus élevé sont retenues pour l'ACP et l'AFD. La réduction de ce nombre de variables avant de procéder à l'analyse multidimensionnelle permet de s'assurer de l'obtention de résultats fiables. De tels résultats sont obtenus avec un rapport nombre d'échantillons/nombre de variables supérieur à 3.

25 Une fois le nombre de variables réduit, une analyse en composantes principales, ACP, est effectuée sur les données. Cette technique calcule de nouvelles variables (composantes principales orthogonales) par combinaison linéaire des variables originales, à partir de l'ensemble des individus (cépages, clones) auxquels sont associés des caractères quantitatifs. Ces composantes principales permettent de distinguer le mieux

30

possible les individus, sans présupposer l'existence de regroupements parmi les individus.

L'analyse est réalisée sur des données brutes. On obtient une représentation des individus dans un plan à deux dimensions où le premier axe calculé possède la plus grande variance conduisant à la plus grande dispersion des individus sur cet axe. Cette analyse permet de détecter l'existence de groupes ou d'individus atypiques.

Pour discriminer de manière optimale les individus constitués de sous-groupes définis (variétés, cultivars, clones...), ces distinctions n'étant pas exhaustives, ni limitatives, par les résultats de l'ACP, on réalise avantageusement une AFD. A cet effet, on calcule de nouvelles variables, combinaisons linéaires des variables originales, en recherchant un centre de gravité pour chaque groupe le plus éloigné possible. L'AFD est ensuite utilisée pour l'affectation d'individus supplémentaires à l'un des groupes précédents.

Les étapes qui précèdent sont avantageusement réalisées sur les extraits polyphénoliques totaux d'un matériau végétal de l'espèce végétale ou de l'hybride à étudier, ou d'un produit élaboré à partir de cette espèce végétale ou de cet hybride, ce matériau et ce produit étant appelés ci-après matières premières.

Ces matières premières sont soumises à une et, avantageusement, plusieurs extractions réalisées dans des conditions identiques. On utilise des solvants organiques, le cas échéant additionnés d'eau. Des solvants appropriés comprennent l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'éther, seuls ou en mélange.

Pour des commodités de manipulation, il est avantageux d'utiliser ces extraits sous forme lyophilisée.

Les matières premières proviennent d'espèces végétales ou de leurs hybrides possédant des organes végétaux riches en composés polyphénoliques. On citera tout particulièrement la vigne, le champ de l'invention s'étendant toutefois à la reconnaissance d'autres tanins que ceux de la vigne, comme les tanins oenologiques de pin, de chêne, ou de noix de galle.

La technique de différenciation de l'invention présente également un grand intérêt pour la reconnaissance de différentes variétés d'arbres fruitiers (par exemple de pommiers), ou de variétés florales (notamment de rosiers), ou encore de plantes médicinales. Les organes végétaux utilisés pour l'obtention des extraits sont choisis, avantageusement, en tenant compte de leur richesse en composés polyphénoliques et de leur traitement facile. Il s'agit par exemple de feuilles, de graines, de pépins ou, le cas échéant, d'écorces ou de pétales de fleurs.

Les produits élaborés à partir de l'espèce ou de l'organe végétal comprennent du jus de fruits, ou des produits issus de leur fermentation, comme le vin ou la bière.

L'invention fournit ainsi les moyens, à partir du contenu polyphénolique d'un extrait de végétal, d'établir un ensemble de données caractéristiques d'une espèce végétale ou de ses hybrides et, selon un aspect de grand intérêt, de taxons de rang inférieur de cette espèce végétale ou de ses hybrides.

Compte-tenu du caractère constant obtenu pour ces données, dans les conditions énoncées ci-dessus, ces dernières sont utilisées selon l'invention pour constituer une banque servant de référentiel.

Ce référentiel est donc établi, par accumulation de résultats, en opérant dans des conditions

identiques, pour une espèce végétale et ses hybrides, ou pour les taxons de rang inférieur, selon l'organe végétal ou le produit élaboré à partir de l'organe végétal, d'où sont extraits les composés polyphénoliques.

5 L'invention vise un procédé d'identification d'une espèce végétale ou de ses hybrides et de leurs taxons de rang inférieur, caractérisé en ce qu'on soumet un extrait provenant d'un organe végétal, ou d'un produit élaboré à partir de cet organe ou de l'espèce végétale,
10 de ses hybrides et de leurs taxons de rang inférieur, à une analyse par RMN multidimensionnelle et au traitement des données de RMN comme indiqué ci-dessus, et on compare les résultats obtenus aux données d'un référentiel correspondant à l'espèce.

15 L'invention fournit ainsi les moyens de contrôler avec une grande précision une origine et, par là, un ensemble de qualités d'un matériau végétal ou d'un produit élaboré à partir de ce matériau, comme les jus de fruits ou des produits issus de leur fermentation comme
20 le vin ou la bière.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent aux fins d'illustration.

25 Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 17, qui représentent respectivement :

- les figures 1 à 3, représentent respectivement les cartes de l'HMBC-GAS, l'HMQC et l'HMQC-HOHAHA d'extraits de pépins de raisin du clone Merlot Noir 343,
- 30 - la figure 4, les résultats de l'ANOVA sur l'HMBC d'extraits de pépins de différents cépages,
- la figure 5, la classification hiérarchique pour ces cépages (sur HMBC-GAS),

- les figures 6 et 7, les résultats respectivement de l'ACP et de l'AFD sur l'HMBC-GAS de ces cépages,

5 - les figures 8, 9 et 10, les résultats de l'ANOVA sur l'HMBC-GAS, respectivement de Merlot Noir, Cabernet Franc et Cabernet Sauvignon,

- les figures 11, 12 et 13, les résultats de l'ACP sur l'HMBC-GAS, respectivement de Merlot Noir, Cabernet Franc et Cabernet Sauvignon,

10 - les figures 14, 15 et 16, les résultats correspondant de l'AFD,

- la figure 17, la carte de l'HMBC-GAS gradients de feuilles de vigne de Cabernet Sauvignon 337, et

15 - la figure 18, les résultats de l'ANOVA sur l'HMBC-GAS de feuilles de vigne.

Exemple 1 : Etude d'extraits de pépins de raisin.

20 On rapporte un protocole opératoire appliqué aux pépins de raisin de clones de trois cépages .

Il s'agit des cépages de Cabernet Franc (en abrégé CF), Cabernet Sauvignon (en abrégé CS), et Merlot Noir (en abrégé MN) et des clones : N° 312, 332, 331, 330, 187 de Blanquefort et, N° 312, 332, 331 de
25 Montagne, pour CF ; N° 335, 337, 339, 341, 191 pour CS et N° 181, 343, 346, 347, 348 pour MN.

Ce protocole opératoire comprend : I. l'extraction des polyphénols ; II. l'analyse RMN des extraits obtenus ; III. l'intégration des données de l'analyse RMN ; et IV.
30 une analyse statistique de ces résultats.

Chacune de ces étapes est détaillée ci-après.

I. Extraction des polyphénols

Trois extraits de chaque clone ont été préparés en procédant comme suit :

5 On fait macérer 50 g de pépins de raisins secs pendant 24 heures à l'abri de la lumière dans 60 ml de mélange acétone/eau (2/3).

On soumet le mélange à une étape de lixiviation pendant 15 minutes. On récupère une première fraction.

10 On ajoute 310 ml du même mélange de solvant aux pépins macérés et on le soumet à une lixiviation pendant 10 à 12 heures. On récupère une deuxième fraction.

On réunit les deux fractions et on évapore l'acétone sous pression réduite à 30°C.

15 On extrait la solution restante par de l'acétate d'éthyle (AcOEt), selon le schéma suivant :

	Volume AcOEt (ml)	Agitation
	200	10 min
	100	5 min
	100	5 min
20	50	5 min

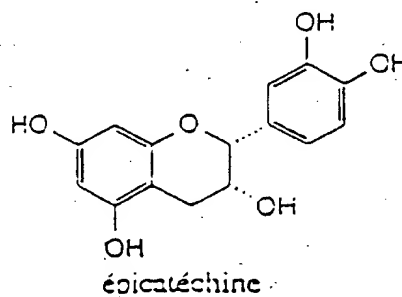
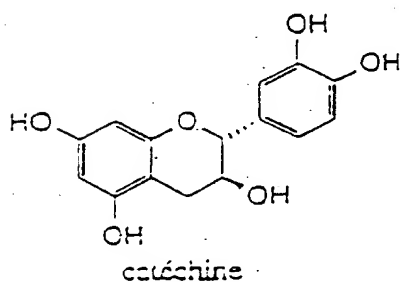
Les deux couches sont alors centrifugées pour éliminer l'interface insoluble.

Après évaporation de l'acétate d'éthyle, on dissout l'extrait dans l'eau, puis on le lyophilise.

Le rendement d'extraction est de 2g/100g de pépins secs environ.

Les extraits polyphénoliques des pépins renferment principalement des flavanols, catéchine et épicatechine, répondant aux formules suivantes, ainsi que leurs polymères.

10



15

II. Analyse par RMN

20

Une quantité d'extrait identique pour chaque clone (100 mg) est dissoute dans du diméthyl sulphoxyde deutérié (DMSO-d₆) et analysée par RMN 2D. Trois expériences sont enregistrées pour chaque extrait :

On utilise une sonde de détection dite inversée ^1H - ^{13}C , qui présente l'avantage d'une très grande sensibilité ^1H .

On obtient

- 5 - le spectre du proton par projection sur l'axe horizontal,
- le spectre du carbone ^{13}C par projection sur l'axe vertical,
- les corrélations entre ces deux noyaux
- 10 (taches de corrélation de la carte 2D) par le biais de leur couplage mutuel.

Expérience 1 : Analyse HMBC (ref 1) donnant les corrélations hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) à longues distances ($^2\text{JC-H}$ et $^3\text{JC-H}$).

- 15 Les références numériques "ref. 1" et suivantes sont précisées dans la partie "Bibliographie" en fin de description.

La séquence d'impulsion utilisée est celle d'une HMBC -GAS.

- 20 Les paramètres d'acquisition sont les suivants. La fréquence d'excitation dans la dimension ^1H est de 500,14021 MHz et de 125,7728 MHz dans la dimension ^{13}C . La fenêtre spectrale est de 5319,15 Hz dans la dimension ^1H et de 27670,02 Hz dans la dimension ^{13}C .

- 25 Chaque signal de précession libre (FID) est digitalisé sur 2048 points et 512 expériences sont enregistrées dans la dimension ^{13}C . Les données d'acquisition sont tout d'abord multipliées par une sinusoïde carrée pour augmenter le rapport signal/bruit

(S/B) et subissent une Transformée de Fourier en magnitude. Pour chaque expérience, 16 FID sont accumulés. Le temps d'expérience est de 4 h.

Expérience 2 : Analyse HMQC (ref 2) donnant les
5 corrélations hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) directes (^1JC -H).

Les principaux paramètres d'acquisition des données sont les suivants.

La fréquence d'excitation dans la dimension ^1H est de 500,139658 MHz et de 125,7672 MHz dans la
10 dimension ^{13}C . La largeur spectrale est de 3787,88 Hz dans la dimension ^1H et de 16520,27 Hz dans celle du ^{13}C .

Chaque FID est digitalisé sur 2048 points et 256 expériences sont enregistrées dans la dimension ^{13}C contre 512 expériences pour l'HMBC-GAS. Cette réduction
15 du nombre d'expériences détériore la résolution des taches de corrélation dans la dimension ^{13}C , mais permet de conserver un temps d'expérience identique à celui de l'HMBC. Pour chaque expérience, 32 FID sont accumulés pour parvenir à un rapport S/B convenable. Le temps
20 d'expérience est de 5 h.

Les données d'acquisition sont tout d'abord multipliées par une fonction sinusoidale carrée pour augmenter le rapport S/B et subissent une Transformée de Fourier en amplitude, puis sont phasées.

Expérience 3 : HMQC-HOHAHA (ref. 3) donnant les
25 corrélations hétéronucléaires (^1H - ^{13}C) relayées aux protons couplés.

Les principaux paramètres expérimentaux correspondent à ceux de l'HMQC auxquels est ajouté "un
30 temps de mélange" (spin-lock).

Les trois expériences sont enregistrées à 303 K. Le spectromètre est équipé d'un système de régulation de la température très stable, ce qui évite des perturbations sur les cartes RMN, comme des traînées au
5 niveau des taches de corrélation.

Les cartes de RMN obtenues à l'issue de chacune de ces trois expériences sont données respectivement sur les figures 1 à 3.

III. Intégration

10 L'information contenue dans les cartes RMN 2D de chaque clone est traduite en données numériques par le calcul du volume de chaque pic de corrélation en utilisant un système informatisé.

15 A cet effet, on délimite des secteurs autour de chaque tache de corrélation et le volume est calculé en additionnant tous les points présents dans le secteur (chaque tache de corrélation est digitalisée en points d'intensité variable).

20 Les données obtenues font ensuite l'objet d'une analyse statistique multidimensionnelle.

IV. Analyse statistique multidimensionnelle des données obtenues avec l'HMBC-GAS

IV.A. analyse des cépages :

a) analyse de variance (ANOVA)

25 Par analyse de variance, on sélectionne les taches de corrélation (variables) qui apportent le plus d'informations (ref 4 et 5).

Pour les données obtenues avec l'HMBC-GAS, qui sont représentées sur la figure 4, les variables les plus discriminantes (F supérieur à 150) sont les suivantes : N° 22, 25, 27, 28, 31, 32, 34, 35, 37, 38, 42 et 44.

- 5 Ces variables correspondent principalement à des taches de corrélation de 1H entre 2 et 3 ppm d'une part et entre 6 et 7 ppm d'autre part.

b) analyse hiérarchique des individus

- 10 On procède ensuite à une classification hiérarchique des individus de telle sorte que les distances entre eux soient fonction de leur similarité et ceci sans présupposer l'existence de groupes.

- 15 Comme le montre la figure 5, qui représente l'analyse des clusters, les cépages sont assez bien différenciés puisque seuls les échantillons marqués d'un astérisque sont mal classés.

- 20 Ces échantillons correspondent aux clones 191 de CS et 343 de MN. Les données d'intégration mettent en évidence qu'ils présentent des caractéristiques différentes des clones issus des mêmes cépages.

c) analyse en composantes principales (ACP)

- 25 Cette analyse (ref 6, 7 et 8) permet une analyse des individus (clones) dans un espace à deux dimensions, les individus étant initialement présents dans un espace à N dimensions, N étant le nombre de variables sélectionnées. On étudie ainsi la structure des individus de manière à pouvoir déterminer l'existence possible de groupes et d'anomalies.

Les résultats obtenus représentés sur la figure 6, pour F supérieur à 30, montrent que les cépages sont dans l'ensemble bien différenciés.

5 Les clones à l'intérieur du cépage CS sont également bien différenciés, avec une plus ou moins grande similarité des clones.

10 Il n'en est pas de même pour les autres cépages, ce qui résulte vraisemblablement du choix de variables selon le critère du cépage, qui ne sont pas discriminantes pour les clones des cépages CF et MN.

d) analyse factorielle discriminante (AFD)

15 Cette analyse dispose les échantillons dans un espace à deux dimensions de manière à avoir les barycentres des groupes pré-définis (ref 6, 7 et 8) les plus éloignés possibles, ceci en construisant des axes discriminants qui sont des combinaisons linéaires des variables de départ. On rapporte sur la figure 7 les résultats de l'AFD obtenue à partir des données de l'HMBC-GAS (F supérieur à 150).

20 On constate que dans l'ensemble les cépages sont bien séparés.

Etude des modèles statistiques

25 Pour valider la technique de discrimination des cépages et des clones, la robustesse des modèles a été testée par des tests statistiques (Test de Jacknife et Validation croisée).

30 Chaque individu a été enlevé successivement, avec remise à la population de départ puis une AFD a été effectuée et les coordonnées de l'individu enlevé ont été calculées à partir des équations discriminantes. On vérifie alors si l'individu est affecté dans le bon groupe. On considère que la technique est validée

lorsqu'on obtient des équations discriminantes stables quelque soit l'individu enlevé et que le pourcentage d'individus bien classés est élevé.

5 A chaque opération, de nouveaux axes discriminants ont été obtenus :

$$X_1 = a_{11}Var_1 + a_{12}Var_2 + \dots + a_{1p}Var_p$$

$$X_2 = a_{21}Var_1 + a_{22}Var_2 + \dots + a_{2p}Var_p$$

.....

$$X_n = a_{n1}Var_1 + a_{n2}Var_2 + \dots + a_{np}Var_p$$

10 X_n : axes discriminants

n : nombre d'individus

a_{np} : coefficients des axes discriminants

Var_p : p ème variable sélectionnée par ANOVA

15 A partir de ces données, plusieurs calculs ont été effectués:

Pour connaître l'importance des coefficients des modèles et leur stabilité, la moyenne (m) et, l'écart-type (EC) de chaque coefficient ont été calculés.

20 Le barycentre de chaque groupe a également été calculé à chaque opération et chaque individu affecté au groupe dont le centre de gravité était le plus proche de lui. On peut calculer ainsi le pourcentage d'individus bien classés à chaque fois et étudier le taux de bon classement et la stabilité du classement pour chaque

25 groupe et pour tous les groupes réunis.

Les moyennes (m) et écart-types (EC) des coefficients des axes 1 et 2 sont donnés ci-après (nombre d'individus : 45 données brutes).

5

	Moy.	Axe 1 EC	Coef. Var.	m	Axe 2 EC	Coef. Var.
Coef. 1	24.2	3.51	14.5	28.8	3.56	12.4
Coef. 2	20.5	2.28	11.1	2.75	1.64	59.6
Coef. 3	13.7	4.17	30.4	42	3.89	9.25
Coef. 4	20.9	2.51	12	21	2.35	11.2
Coef. 5	2.94	2.36	80.3	2.11	2.22	105
10 Coef. 6	32.7	2.56	7.82	30.4	2.07	6.83
Coef. 7	11.4	3.75	33	23.3	2.54	10.9
Coef. 8	11.4	3.7	32.5	18.2	3.95	21.6
Coef. 9	13.9	2.15	15.5	5.79	2.19	37.8
Coef. 10	23.7	2.17	9.17	5.56	2.68	48.2
Coef. 11	4.23	1.34	31.7	12.8	1.84	14.3
Coef. 12	4.36	1.44	32.9	5.84	2.08	35.7

15

20 Les calculs effectués pour l'HMBC-GAS montrent que pour l'axe 1, les coefficients 1, 2, 4, 6 et 10 sont les plus importants dans le modèle et ont une bonne stabilité (Ecart-types faibles). Compte tenu des valeurs des coefficients, on en déduit que ce sont les variables

22, 25, 28, 32, 37 et 38 qui sont les plus influentes pour la construction de l'axe 1.

5 Pour l'axe 2, les coefficients 1, 3, 4, 6 et 7 sont les plus importants dans le modèle et ont une bonne stabilité (Ecart-types faibles). Compte tenu des valeurs des coefficients, on en déduit que ce sont les variables 22, 27, 28, 32 et 34 qui sont les plus influentes pour la construction de l'axe 2.

10 Les pourcentages d'individus bien classés sont de 99,85 pour les CF et les MN et de 100 pour les CS, les clones CF312mg et CF331Mg sont responsables du pourcentage des CF du fait de leur proximité des MN.

15 La discrimination des cépages de vigne à l'aide des données RMN de l'HMBC-GAS constitue donc bien une technique fiable compte-tenu des résultats statistiques.

IV.2 analyse des clones

Pour la reconnaissance des clones, les cépages ont été analysés séparément.

- Analyse ANOVA

20 On rapporte sur les figures 8, 9 et 10, les valeurs de F dans l'analyse de variance, obtenues d'après les spectres RMN HMBC-GAS, respectivement pour les clones des cépages MN, CF et CS.

25 On indique ci-après pour chaque cépage la valeur de F sélectionnée et les variables choisies :

Merlot Noir : $F > 10$; variables choisies : 3, 4, 6, 9, 12, 34, 37 ;

Cabernet Franc : $F > 30,5$; variables choisies : 7, 22, 23, 25, 34, 36, 37, 38, 39, 43 ;

Cabernet Sauvignon : $F > 55$; variables choisies : 3, 6, 7, 9, 39, 45, 47.

5 - Analyse ACP

Les résultats de l'analyse ACP sur l'HMBC-GAS des extraits polyphénoliques de pépins pour MN, CF et CS, sont respectivement rapportés sur les figures 11, 12 et 13.

10 On constate pour le Merlot Noir une tendance à se regrouper par clone excepté les individus MN 181 bt et MN 346 bt 194.

15 Pour le Cabernet Franc, les clones ont tendance à former des groupes avec plus ou moins de similitudes entre eux.

Les clones différant uniquement par le terroir (312, 331, 332) se différencient très nettement.

Dans le cas du Cabernet Sauvignon, on remarque une bonne séparation des clones.

20 - Analyse AFD

25 Les résultats de l'analyse factorielle discriminante sur l'HMBC-GAS des extraits de pépins de raisin sont donnés sur les figures 14, 15, et 16 respectivement pour MN ($F > 10$), CF ($F > 30,5$) et CS ($F > 55$).

On obtient dans les 3 cas une bonne différenciation des clones.

La différenciation des cépages et des clones par intégration des corrélations de l'HMBC-GAS constitue donc bien une technique fiable.

5 V - Analyse statistique des données obtenues avec l'HMOC d'une part, avec l'HMOC - HOHAHA, d'autre part.

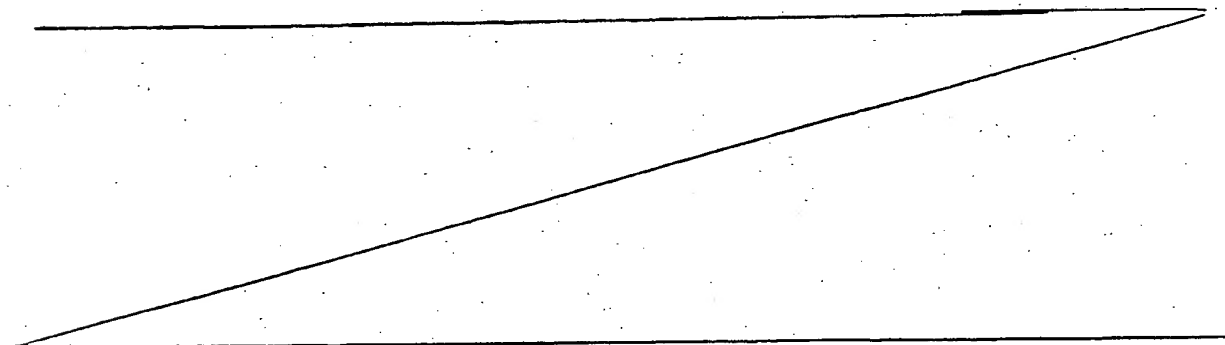
On applique les techniques rapportées ci-dessus aux données des spectres de l'HMOC et de l'HMOC-HOHAHA pour les cépages et les clones.

10 On obtient dans les deux cas une bonne discrimination.

Exemple 2 : Etude d'extraits de feuilles de vigne.

15 On prépare des extraits polyphénoliques de feuilles de vigne à partir des cépages et clones suivants:

Cépages	Merlot Noir MN	clones : 343 et 347
	Cabernet Sauvignon CS	clones : 335 et 337
	Cabernet Franc CF	clones : 312 et 187



I. Extraction des polyphénols

On fait macérer 50 g de feuilles sèches pendant 24 heures à l'abri de la lumière dans 500 ml de mélange acétone/eau (2/3).

- 5 On soumet le mélange à une étape de lixiviation lente pendant 1 à 2 heures.

On fait évaporer l'acétone sous pression réduite à 30°C. Un précipité vert composé principalement de chlorophylle et de cires se forme.

- 10 Pour éliminer les cires et la chlorophylle, on a recours à une étape de centrifugation et à une extraction à l'éther.

On soumet le mélange à une centrifugation pour séparer les deux phases.

- 15 La solution restante est extraite par de l'éther éthylique (Et₂O) selon le schéma suivant :

	V Et ₂ O (ml)	Agitation
	100	10 min
	100	5 min
20	100	5 min

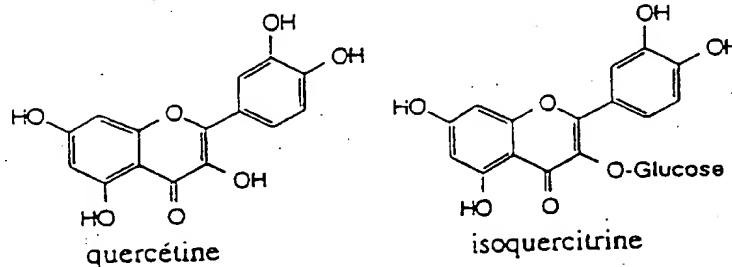
On soumet la phase restante à une étape d'évaporation pour éliminer l'éther résiduel, puis on extrait la solution restante par l'acétate d'éthyle, en opérant comme suit :

	V AcOEt (ml)	Agitation
	200	10 min
	100	5 min
	100	5 min
5	100	5 min
	100	5 min
	100	5 min
	100	5 min
	100	5 min

10 On évapore ensuite l'acétate d'éthyle sous pression réduite et on reprend le soluté par l'eau pour lyophiliser.

Les extraits polyphénoliques obtenus sont essentiellement formés de flavonoïdes, quercétine et
15 isoquercitrine, ces composés répondant aux formules suivantes :

20



25

Le rendement d'extraction est de 3g/100g de feuilles sèches environ.

II Analyse RMN

50 mg d'extrait sont dissous dans 0,5 ml de DMSO-d6. Pour le premier extrait de chaque clone, trois HMBC-GAS sont enregistrées, et pour le second extrait, une seule expérience est enregistrée pour vérifier la reproductibilité de la technique d'extraction.

Les paramètres expérimentaux sont les suivants:

. fréquence d'excitation de ^1H : 500,1412769 MHz
et de ^{13}C : 125,7728 MHz;

. fenêtre spectrale de ^1H : 14,489 ppm et de ^{13}C : 220 ppm.

Le nombre d'accumulations par expérience est de 12. Chaque interférogramme (FID) est digitalisé sur 2048 points et 512 expériences sont enregistrées dans la dimension ^{13}C . La durée de l'expérience est de 2 h. Les données sont multipliées par une fonction sinusoidale carrée et subissent une Transformée de Fourier en mode magnitude.

On a représenté sur la figure 17 la carte de RMN obtenue.

III Analyse statistique

a) ANOVA

On rapporte sur la figure 18 les résultats de l'analyse ANOVA des données des spectres de l'HMBC-GAS.

Les variables les plus discriminantes sont les suivantes ($F > 60$) : N° 113, 115, 117 et 118.

Ces variables correspondent aux taches de corrélation des ^1H à $\delta = 12,5$ ppm avec les carbones à $\delta = 99$ ppm,

$\delta = 145$ ppm, $\delta = 161$ ppm et $\delta = 163$ ppm.

Ces caractéristiques sont celles d'un proton d'un hydroxyle qui est lié par l'établissement d'une liaison hydrogène avec un carbonyle, ce type de protons se retrouve dans les flavonoïdes qui sont les composés majoritaires des extraits de feuilles de vigne.

b) Classification hiérarchique.

En opérant comme indiqué pour les extraits de pépins de raisin, on obtient une différenciation des cépages, en particulier du cépage CS.

c) Analyses ACP et AFD

Dans ces deux expériences, réalisées comme indiqué plus haut, les clones sont d'une manière générale bien séparés.

Les résultats montrent que les extraits de feuille permettent également de déceler une spécificité du contenu polyphénolique de chaque cépage, ou de chaque clone, puisque des différences apparaissent entre les clones et les cépages.

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé d'identification d'une espèce
végétale ou de ses hybrides et des taxons de rang
inférieur de cette espèce végétale ou de cet hybride,
caractérisé en ce qu'on soumet un extrait essentiellement
constitué par des composés polyphénoliques, provenant
10 d'un matériau végétal de la dite espèce végétale ou du
dit hybride et de leurs taxons de rang inférieur, ou d'un
produit élaboré à partir de ce matériau, à au moins une
analyse par RMN multidimensionnelle, suivie d'une analyse
quantitative des signaux et du traitement statistique des
15 données d'intégration, conduisant à l'obtention de
données caractéristiques de l'espèce végétale, de
l'hybride et des taxons de rang inférieur.
2. Procédé selon la revendication 1,
caractérisé en ce que les extraits polyphénoliques sont
20 soumis à une analyse hétéronucléaire ^1H - ^{13}C
bidimensionnelle.
3. Procédé selon la revendication 2,
caractérisé en ce qu'on effectue une analyse HMBC, plus
spécialement une HMBC-GAS.
- 25 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3,
caractérisé en ce qu'on effectue une analyse HMQC.
5. Procédé selon l'une des revendications 2 à
4, caractérisé en ce qu'on effectue une analyse HMQC-
HOHAHA.
- 30 6. Procédé selon l'une des revendications
précédentes, caractérisé en ce que les paramètres
d'acquisition, fréquence d'excitation dans la dimension
 ^1H , fréquence d'excitation dans la dimension ^{13}C et les
fenêtres spectrales dans les deux dimensions sont

déterminés spécifiquement pour chaque type d'analyse et que chaque interférogramme (FID) est multiplié par une fonction sinusoïdale carrée pour augmenter le rapport Signal/Bruit et subit une Transformée de Fourier en mode
5 magnitude dans le cas de l'HMBC-GAS et en mode amplitude, puis phasé, dans le cas d'une HMQC ou d'une HMQC-HOHAHA.

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les taches de corrélation des analyses RMN sont ensuite intégrées et
10 les données obtenues font l'objet d'une analyse statistique multidimensionnelle.

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en qu'on effectue une analyse de variance (ANOVA), et/ou à une analyse en composantes
15 principales (ACP), et/ou une analyse factorielle discriminante (AFD).

9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est réalisé sur les extraits polyphénoliques totaux d'un matériau végétal de
20 l'espèce à étudier, ou d'un produit élaboré à partir de cette espèce ou d'un organe végétal.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le matériau végétal provient d'espèces possédant des organes végétaux riches en
25 composés polyphénoliques ou en tanins, comme la vigne, le pin, le chêne, la noix de galle, d'arbres fruitiers, de variétés florales, ou de plantes médicinales.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les organes végétaux sont des
30 feuilles, des graines, des pépins et, le cas échéant, des écorces, ou des pétales.

12. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le produit élaboré à partir du

matériau végétal est du jus de fruit, ou des produits issus de leur fermentation, comme le vin ou la bière.

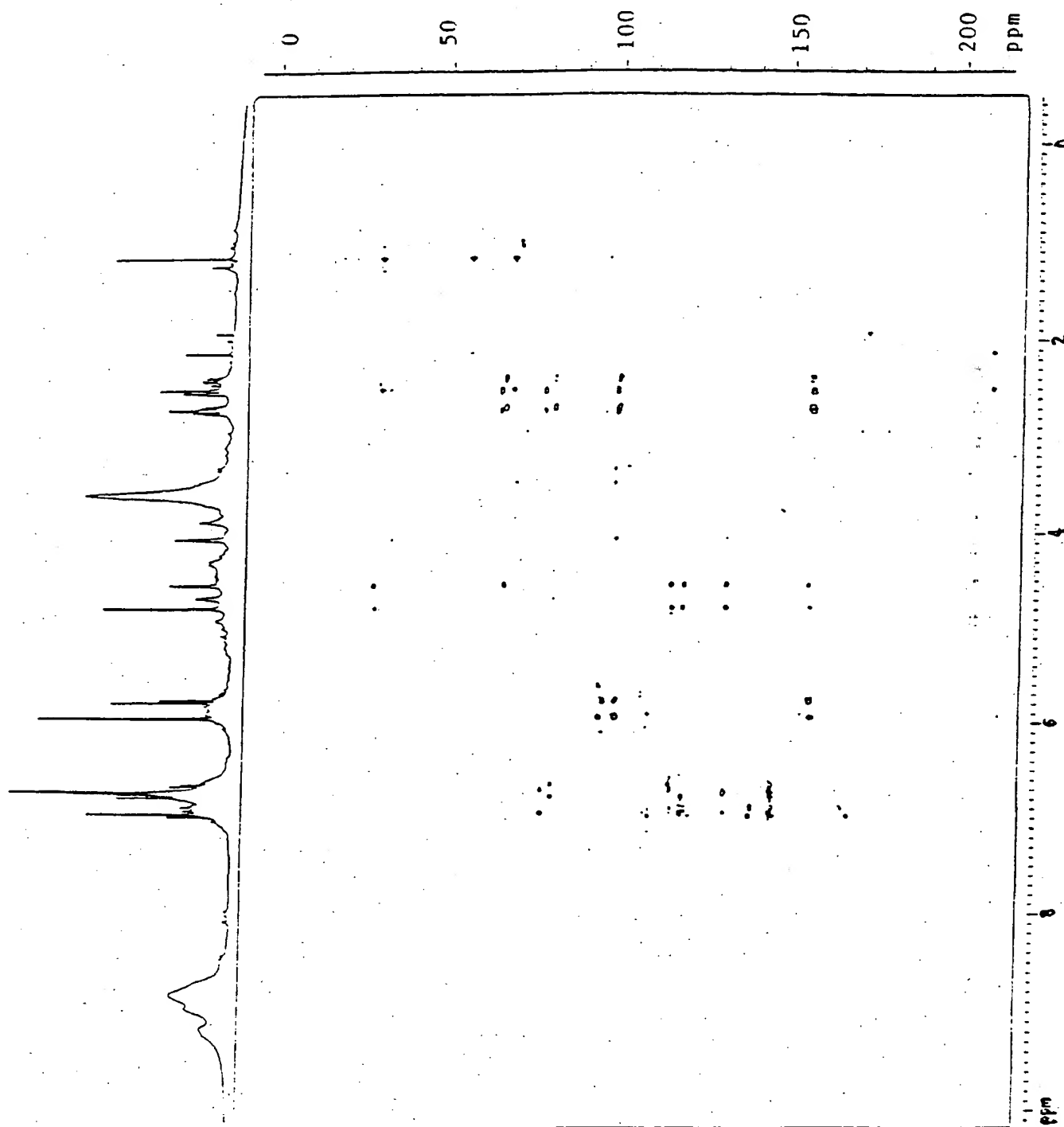
13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est utilisé pour
5 établir un référentiel par accumulation de résultats d'analyses effectuées, en opérant selon les dispositions définies dans les revendications qui précèdent, sur un matériau ou un produit d'une espèce végétale ou d'un hybride donné, ou des taxons de rang inférieur de cette
10 espèce végétale ou de cet hybride, les matériaux ou produits étant traités dans des conditions identiques.

14. Procédé pour le contrôle de l'origine et/ou la qualité d'une espèce végétale, d'un hybride, ou des taxons de rang inférieur de cette espèce végétale ou de
15 cet hybride, caractérisé en ce qu'on soumet un extrait provenant d'un organe végétal, ou d'un produit élaboré à partir de cet organe, ou de l'espèce végétale ou de l'hybride, ou des taxons de rang inférieur, à une analyse
20 par RMN, suivie du traitement des données de RMN comme défini dans l'une des revendications 1 à 12, et de la comparaison des résultats aux données d'un référentiel correspondant à l'espèce végétale, à l'hybride, ou aux taxons de rang inférieur de cette espèce végétale ou de cet hybride, auquel l'élément à analyser est supposé
25 appartenir.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est appliqué à l'identification de cépages et de clones de vigne.

1/18

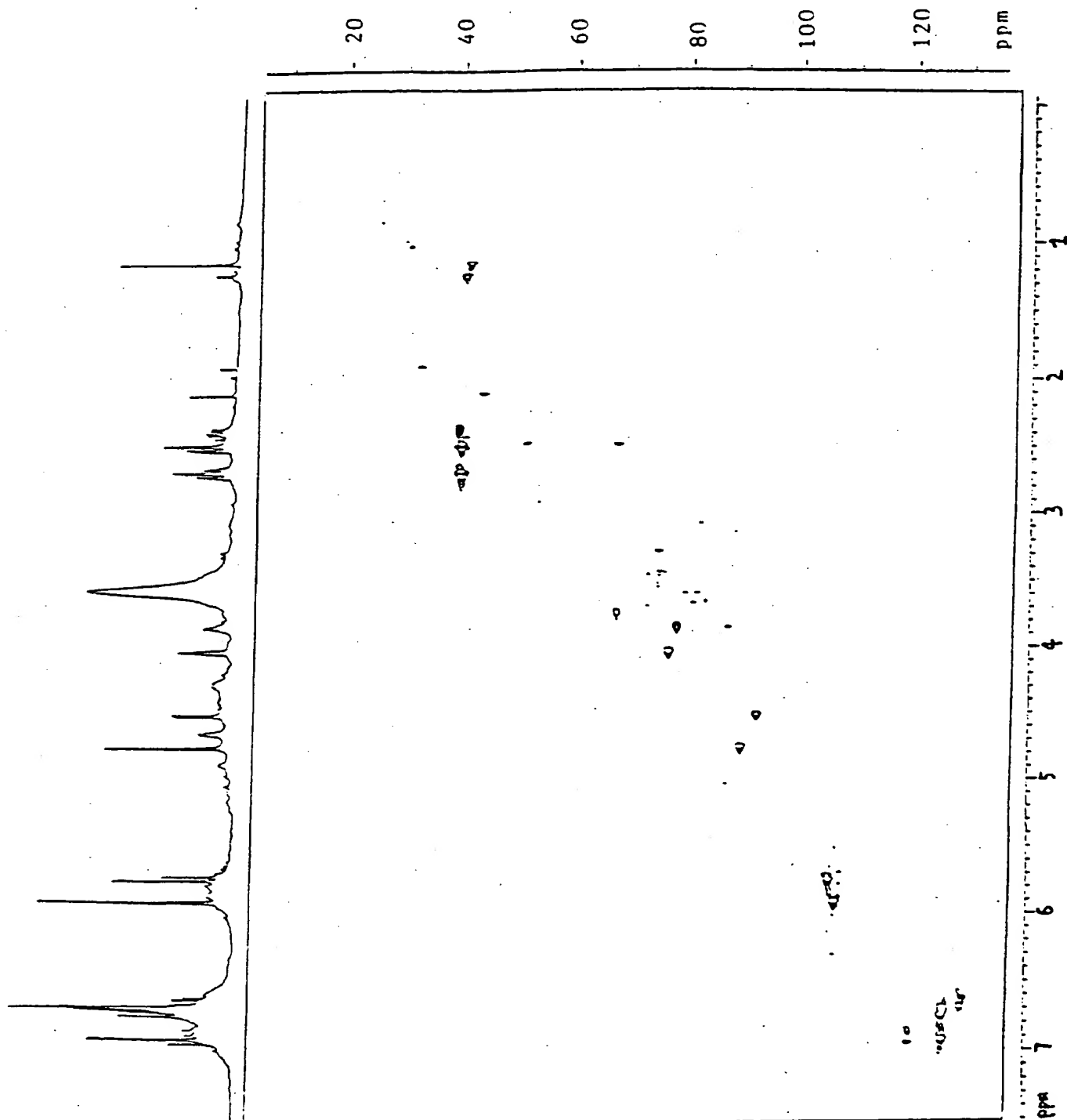
FIGURE 1



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

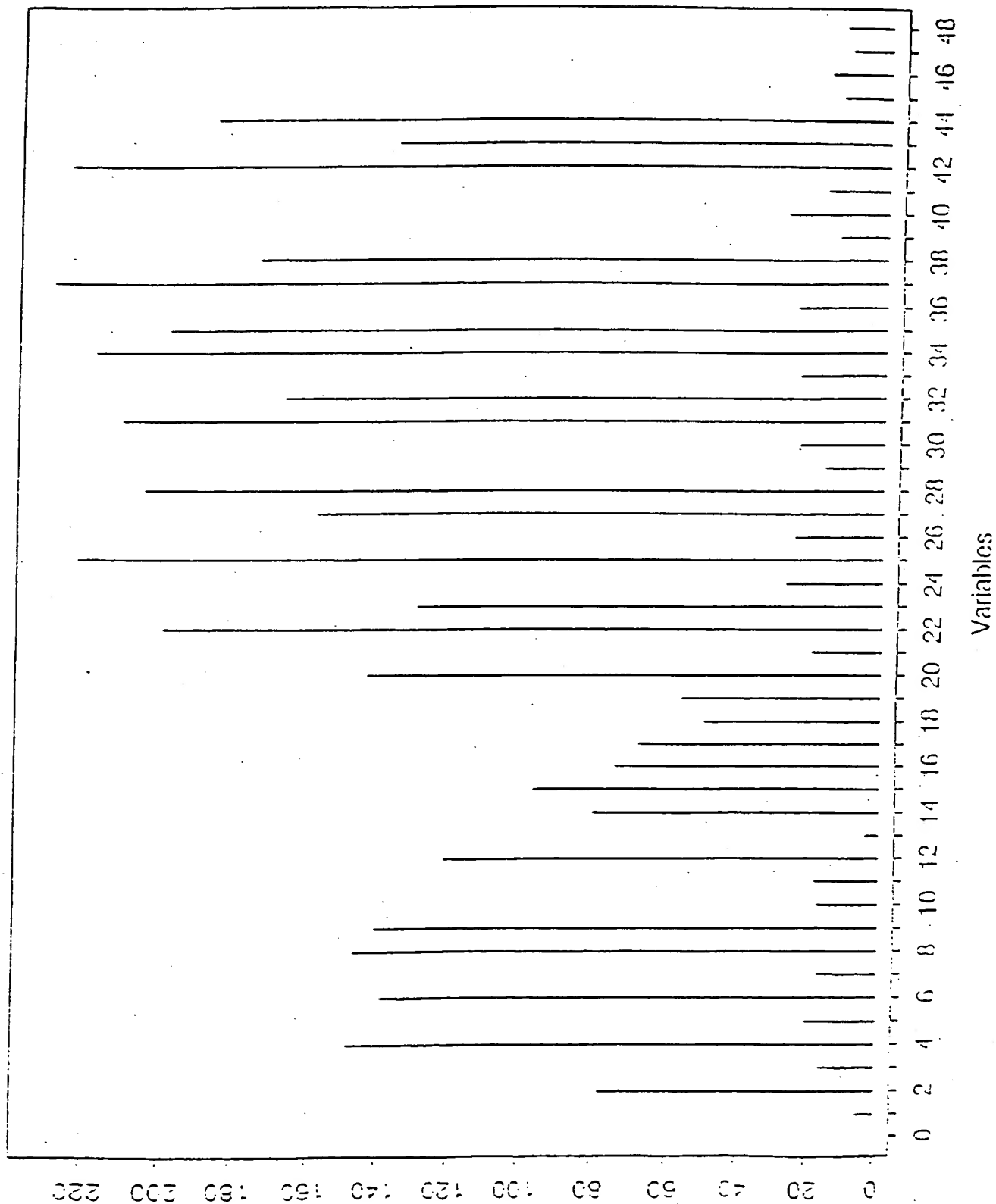
2/18

FIGURE 2



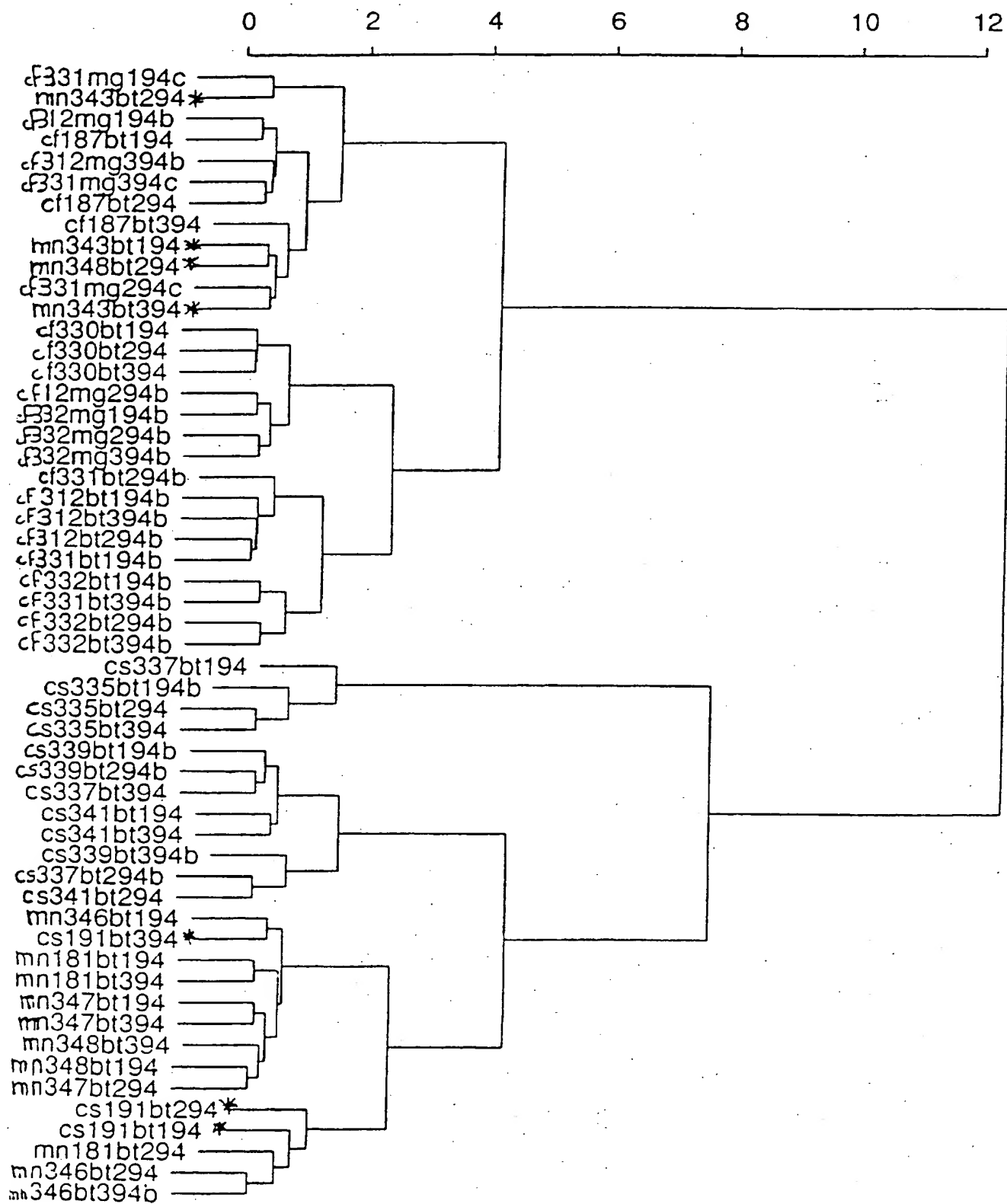
4/18

FIGURE 4



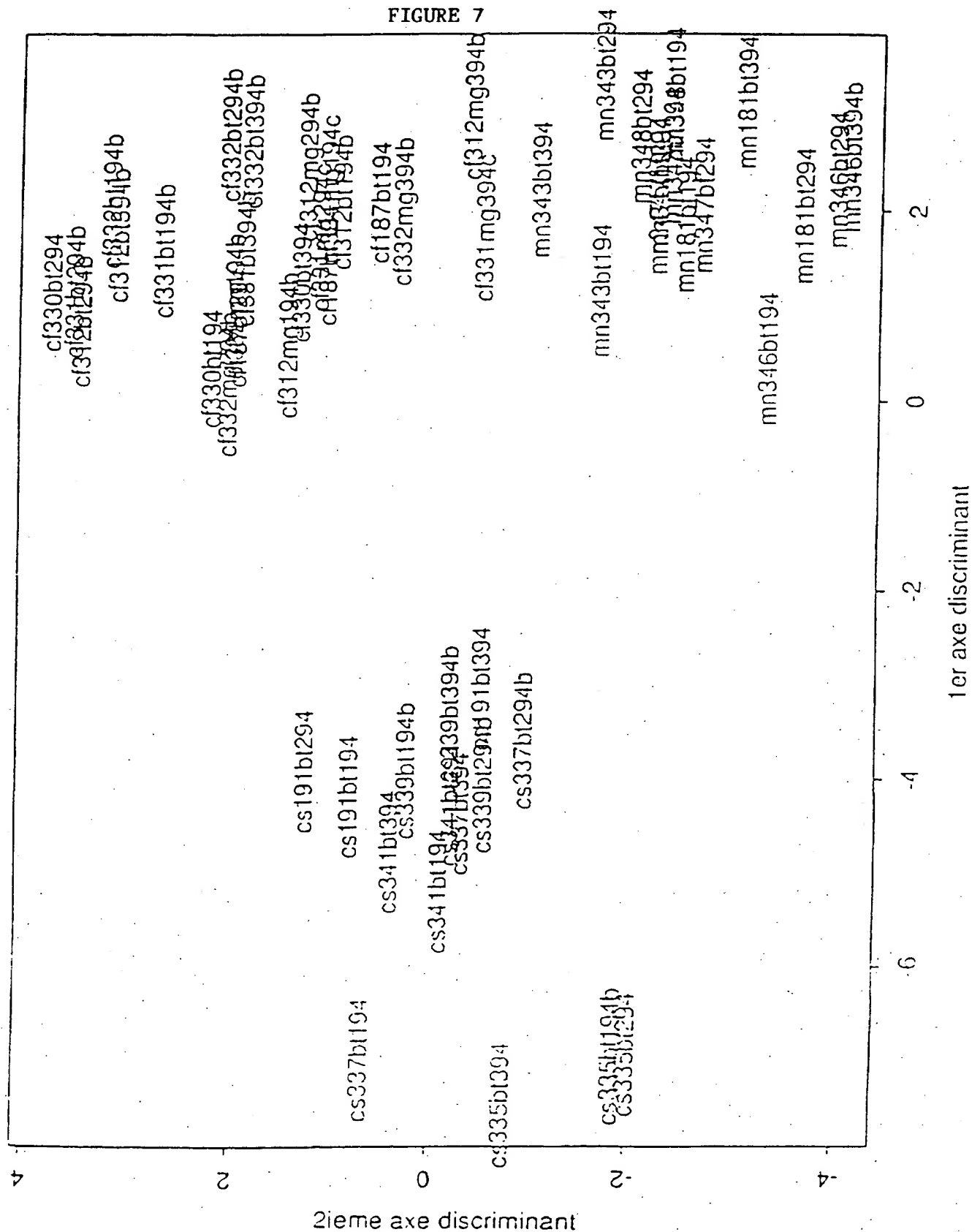
5/18

FIGURE 5



7/18

FIGURE 7

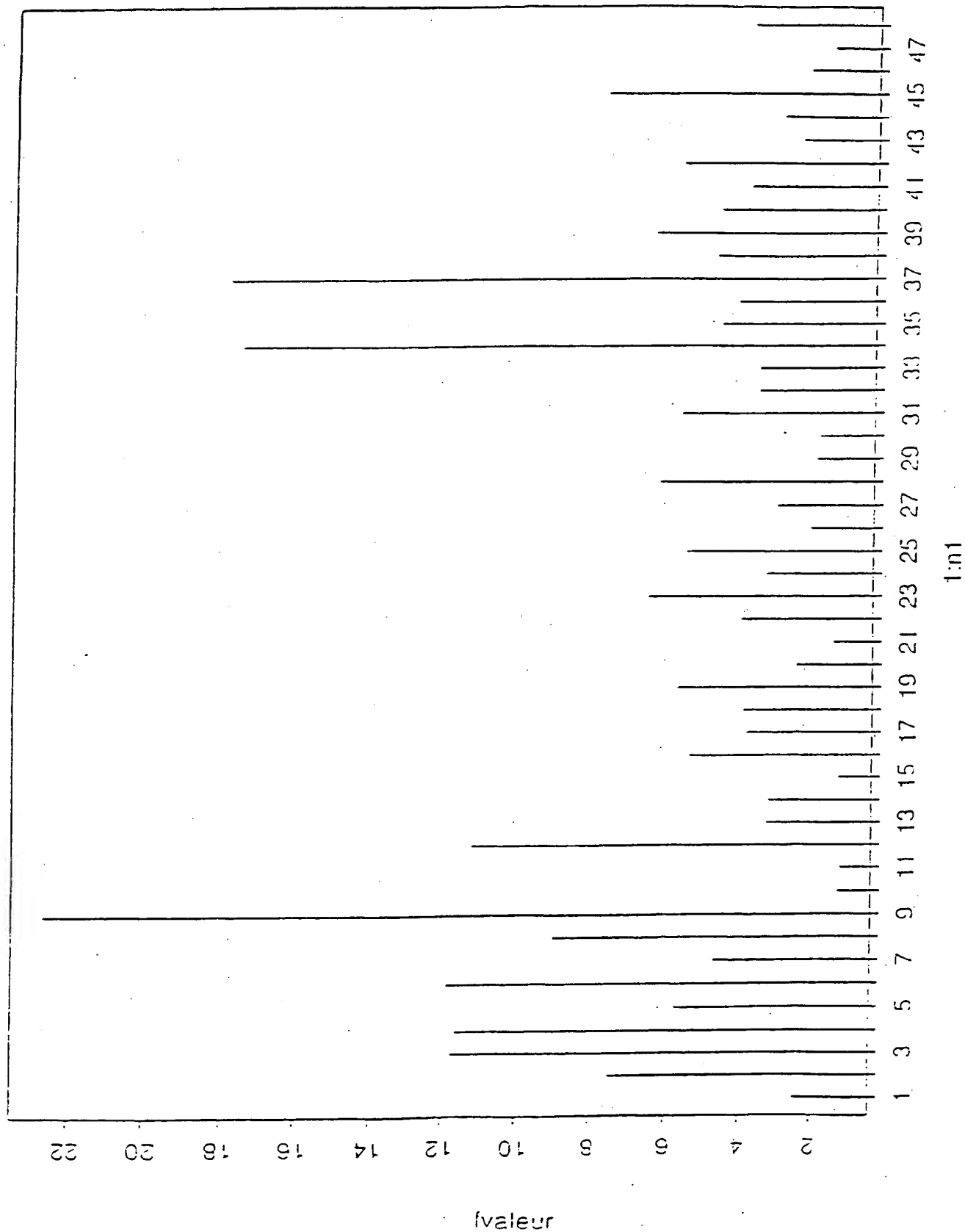


2ieme axe discriminant

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

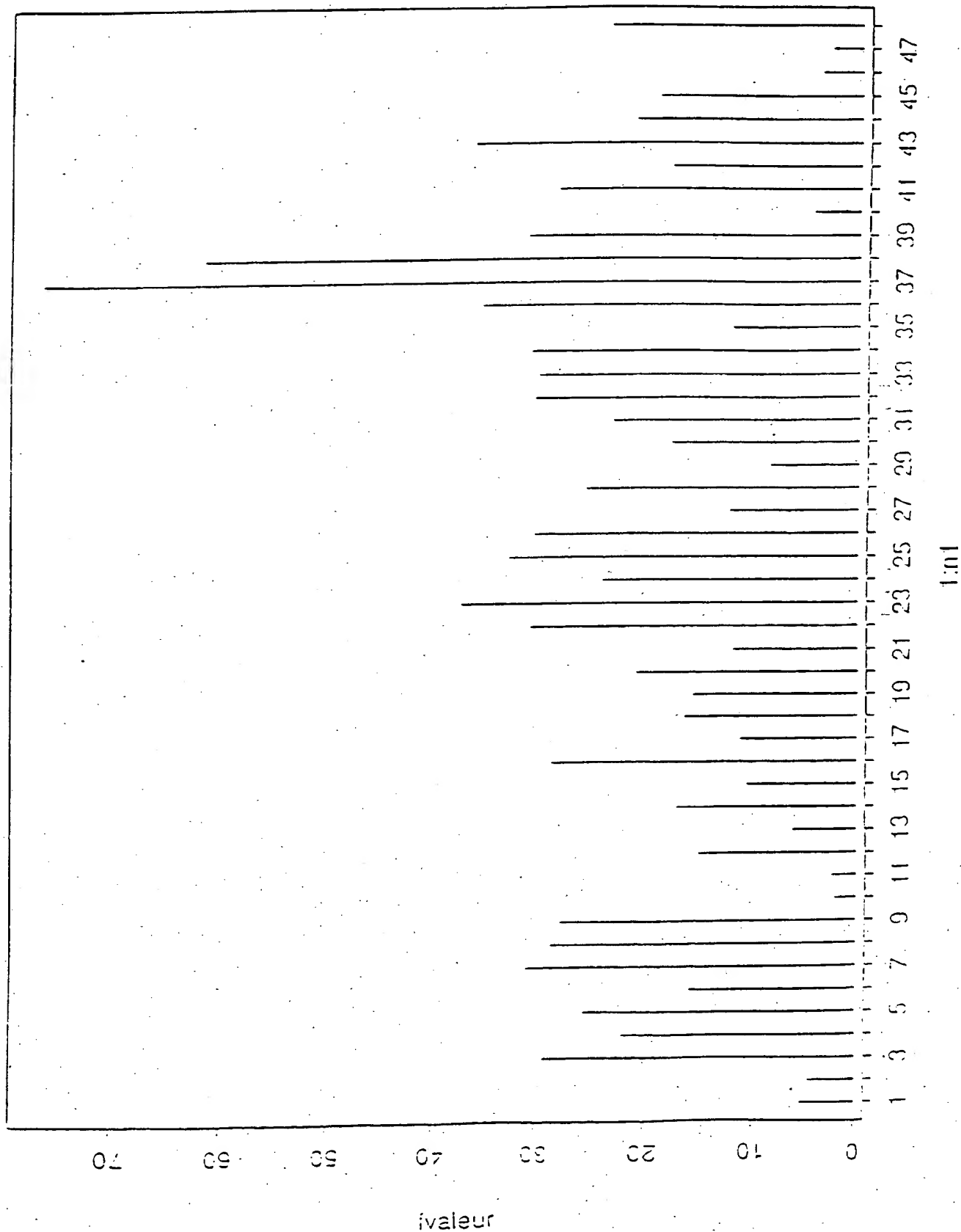
8/18

FIGURE 8



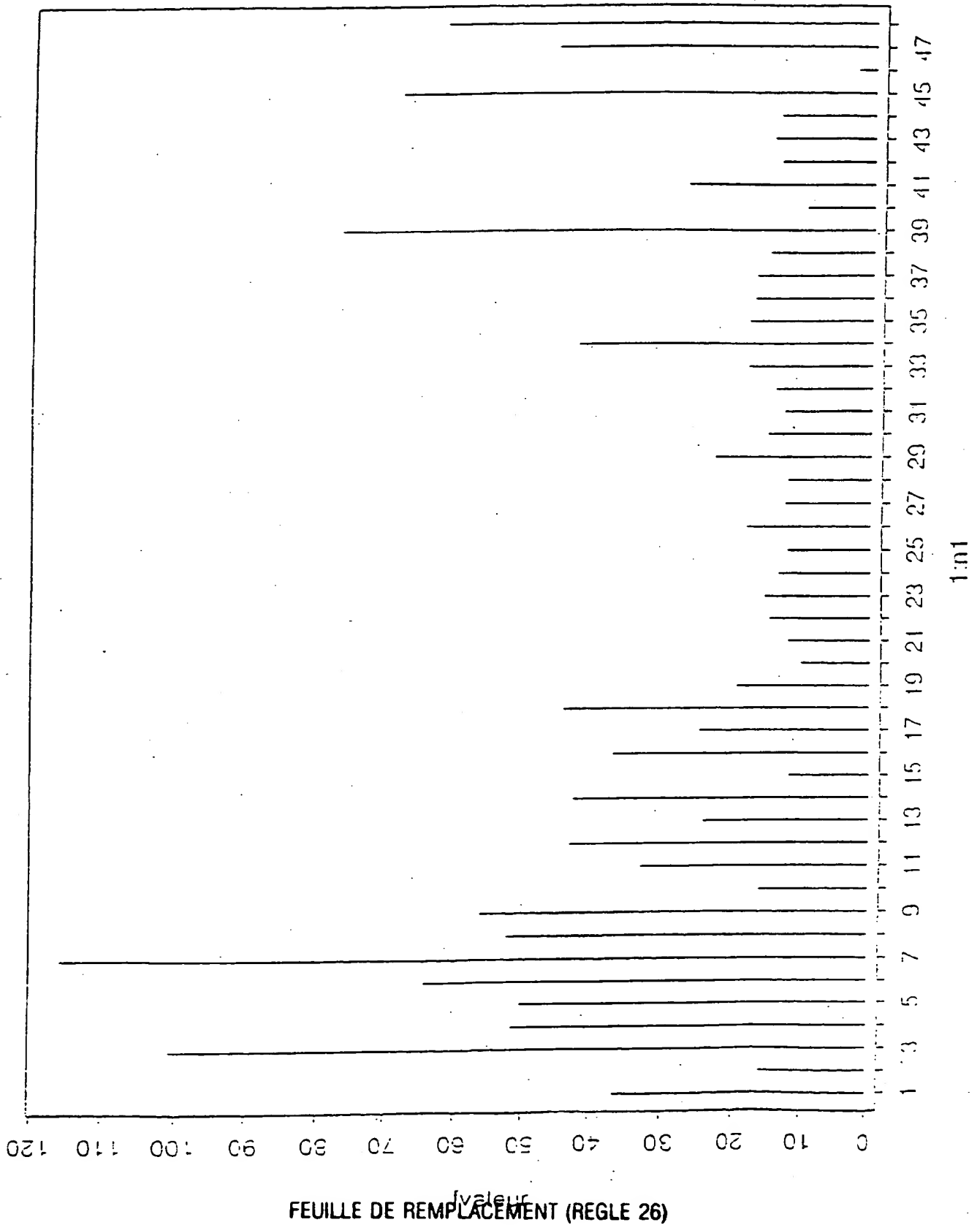
9/18

FIGURE 9



10/18

FIGURE 10



11/18

FIGURE 11

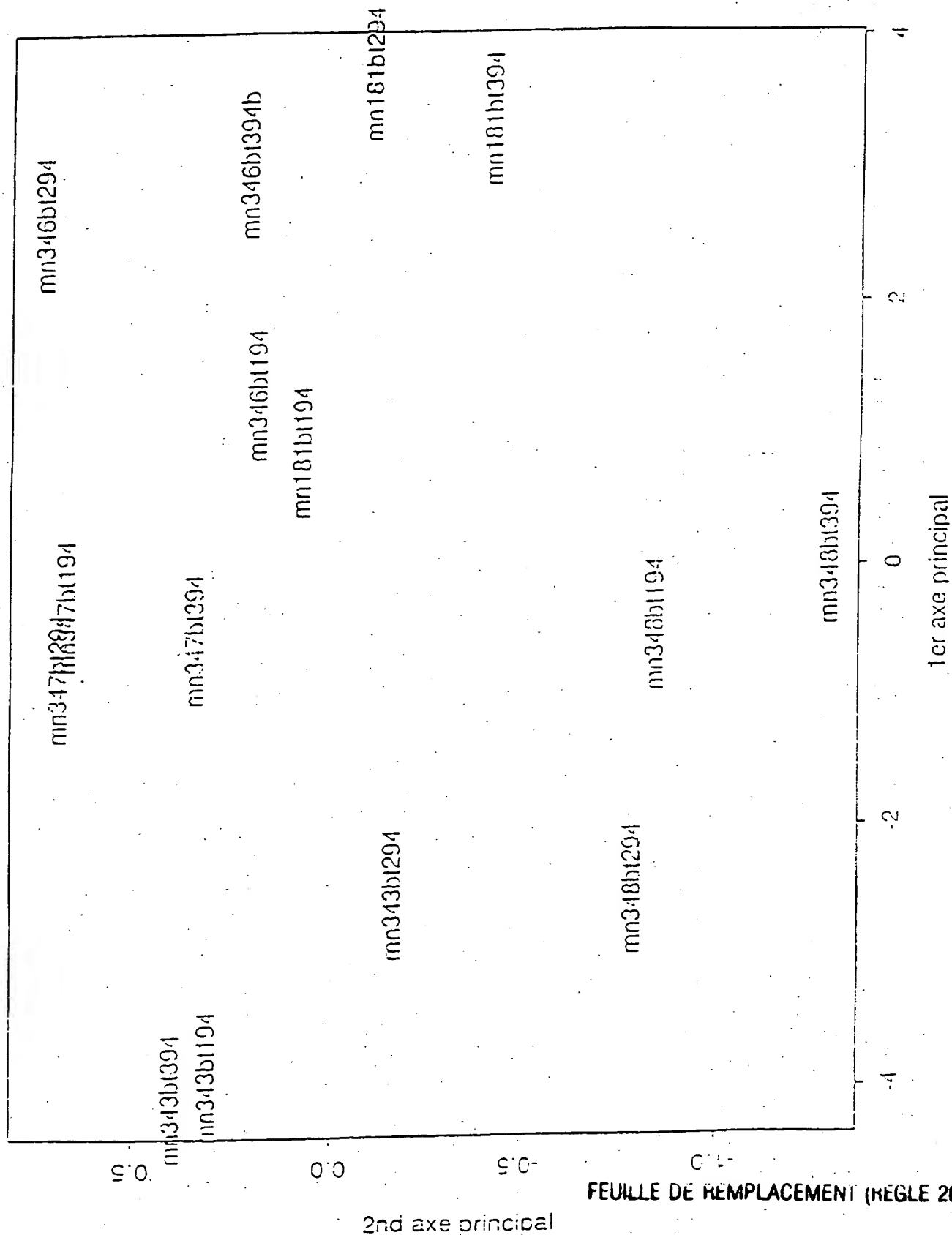
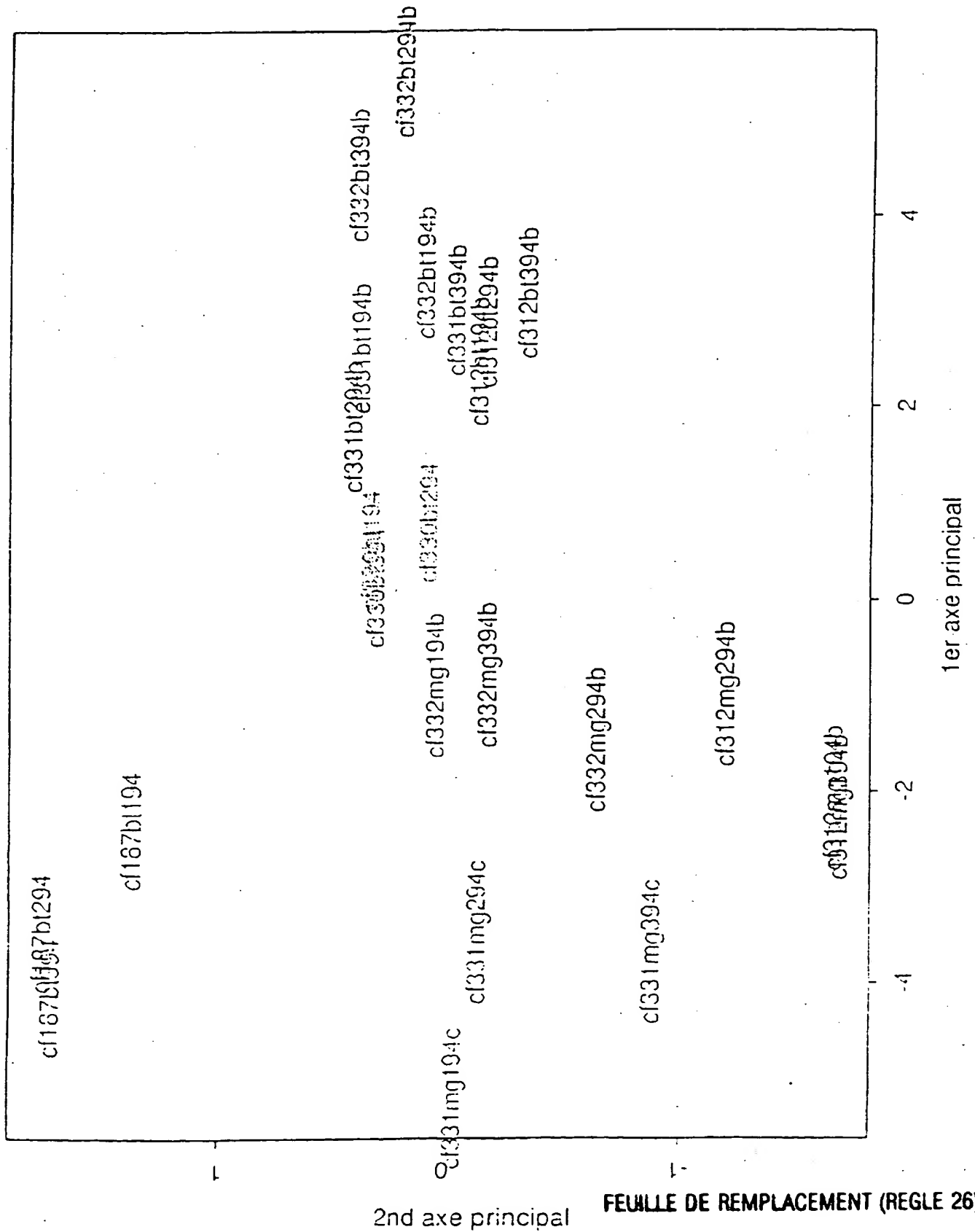
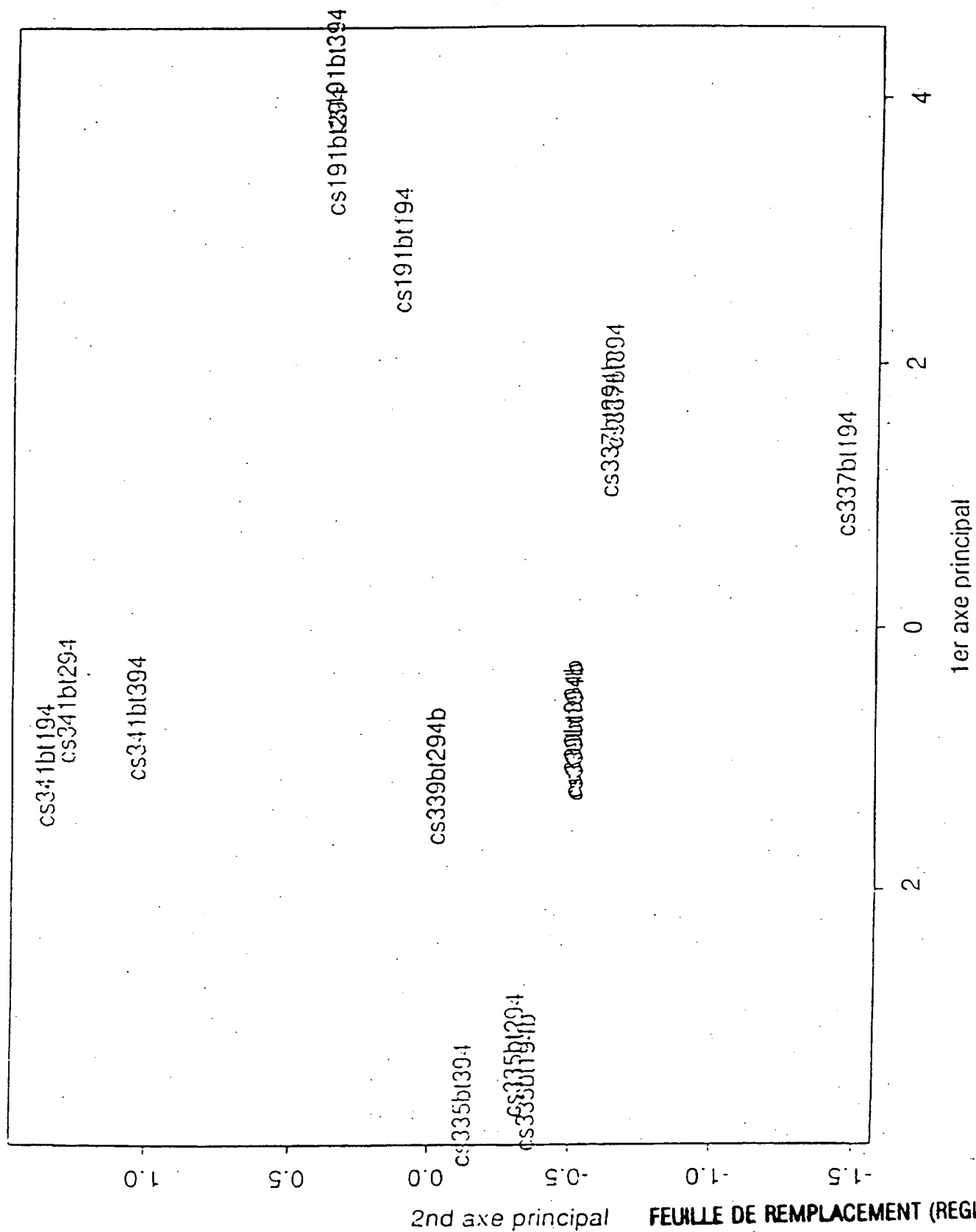


FIGURE 12



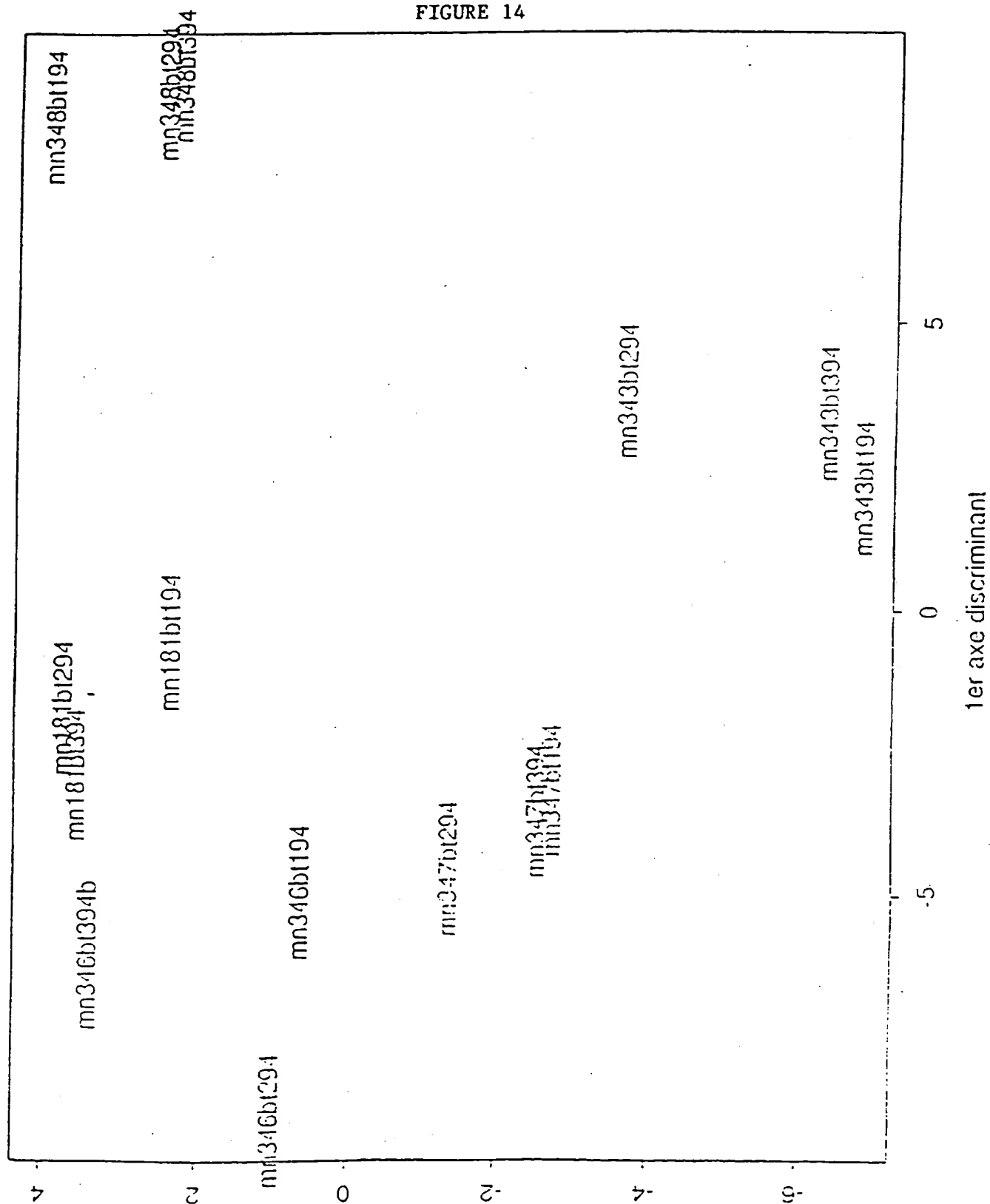
13/18

FIGURE 13



14/18

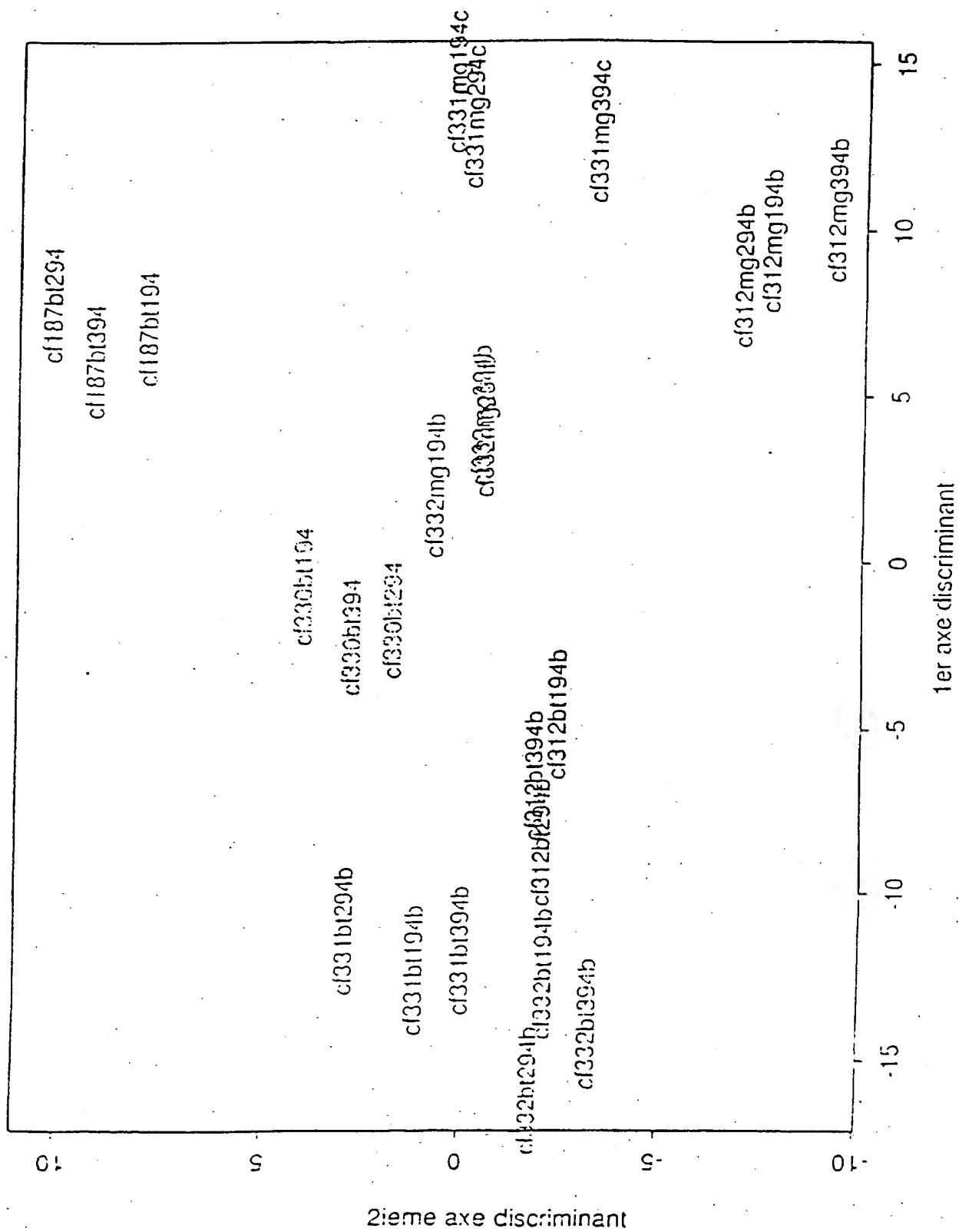
FIGURE 14



2ieme axe discriminant
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

15/18

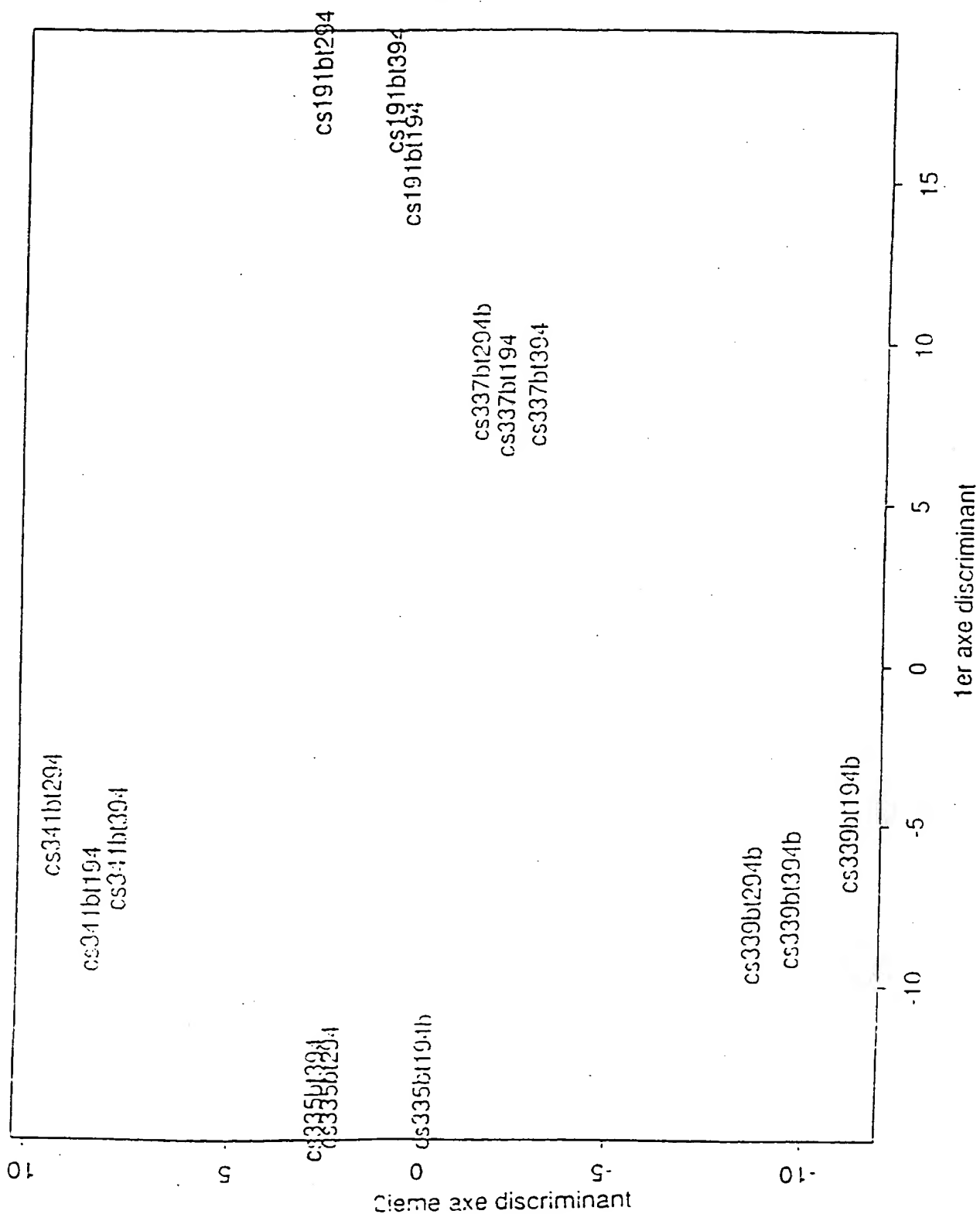
FIGURE 15



2ieme axe discriminant
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

16/18

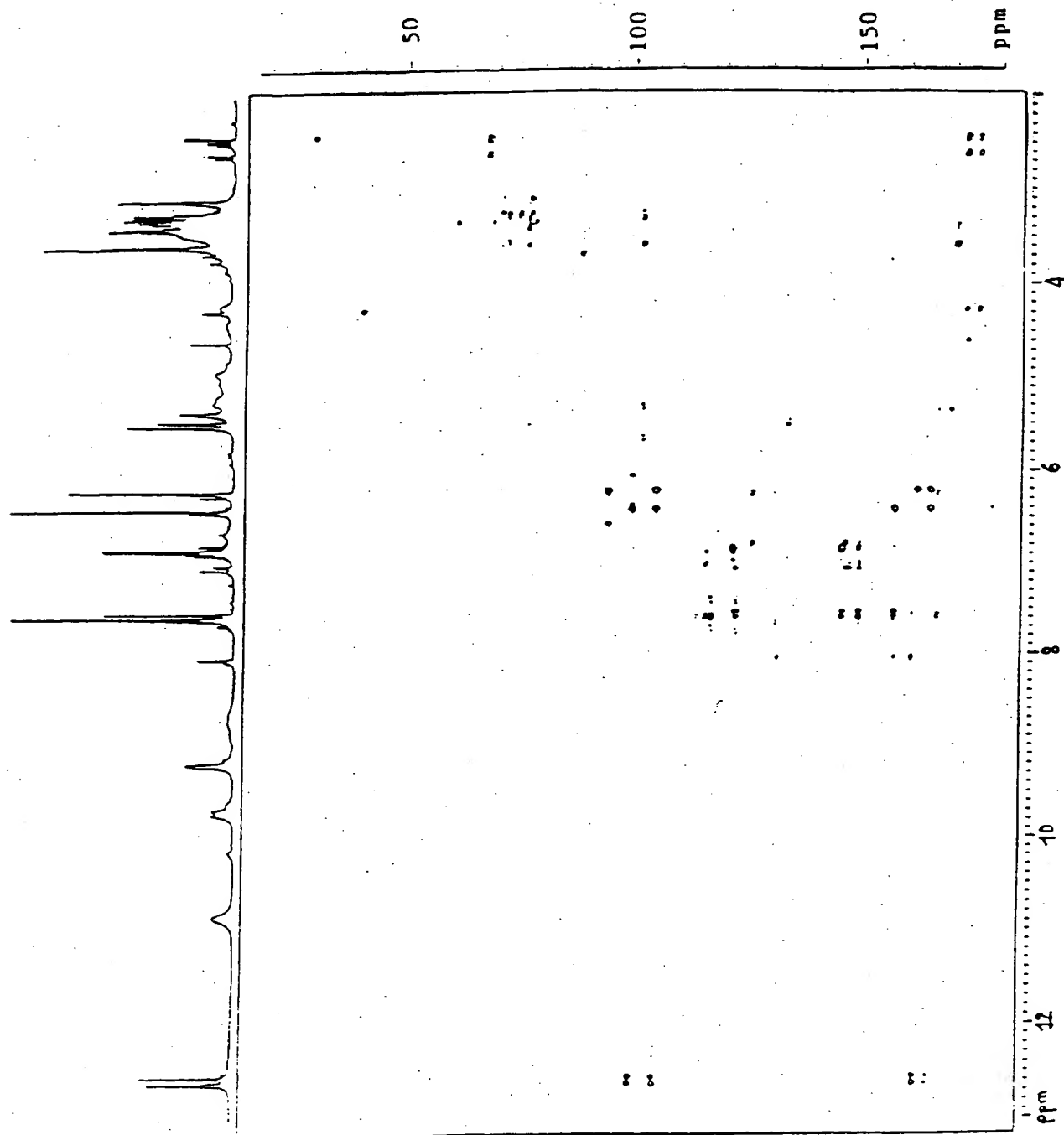
FIGURE 16



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

17/18

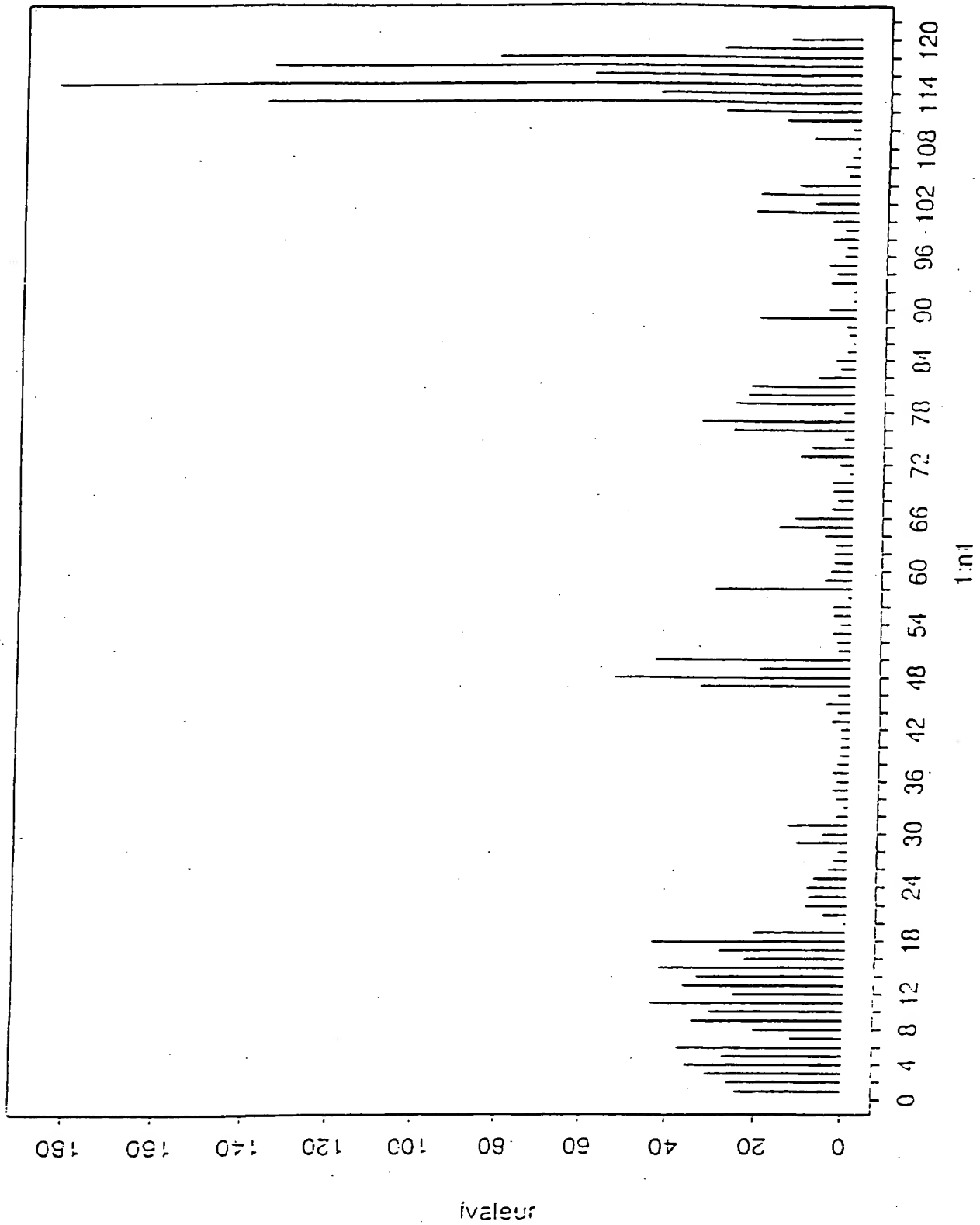
FIGURE 17



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

18/18

FIGURE 18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/FR 95/01660

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01R33/46 G01N24/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01R G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB-A-2 135 059 (GIFU UNIVERSITY (JAPAN)) 22 August 1984 see abstract see page 1, line 6 - page 2, line 59 ---	1,2,6, 10,14
A	FR-A-2 517 828 (G.J. MARTIN ET AL.) 10 June 1983 see page 2, line 10 - page 4, line 18 ---	1,14
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10 no. 298 (P-505) [2354] ,9 October 1986 & JP,A,61 114150 (JEOL LTD.) 31 May 1986, see abstract --- -/--	1,2,6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 1996

Date of mailing of the international search report

03.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (- 31-70) 340-3016

Authorized officer

Horak, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int onal Application No

PCT/FR 95/01660

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10 no. 358 (P-522) [2415] ,2 December 1986 & JP,A,61 155943 (JEOL LTD.) 15 July 1986, see abstract ---	1,10,14
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11 no. 58 (P-550) [2505] ,21 February 1987 & JP,A,61 223639 (JEOL LTD.) 4 October 1986, see abstract ---	1,14
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 41, no. 3, 1 March 1969 COLUMBUS US, pages 538-540, G.A. WARD ET AL. 'APPLICATION OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TO QUANTITATIVE ANALYSIS OF MIXTURES OF ORGANIC PEROXIDES, HYDROPEROXIDES, AND ALCOHOLS' see the whole document -----	1,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/FR 95/01660

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2135059	22-08-84	JP-A- 59136643	06-08-84
		JP-A- 60010160	19-01-85
		DE-A- 3402303	26-07-84

FR-A-2517828	10-06-83	EP-A,B 0090901	12-10-83
		JP-C- 1709393	11-11-92
		JP-B- 3079661	19-12-91
		JP-A- 58154646	14-09-83
		US-A- 4550082	29-10-85

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

No
PCT/FR 95/01660

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01R33/46 G01N24/08

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01R G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GB-A-2 135 059 (GIFU UNIVERSITY (JAPAN)) 22 Août 1984 voir abrégé voir page 1, ligne 6 - page 2, ligne 59 ---	1,2,6, 10,14
A	FR-A-2 517 828 (G.J. MARTIN ET AL.) 10 Juin 1983 voir page 2, ligne 10 - page 4, ligne 18 ---	1,14
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10 no. 298 (P-505) [2354] ,9 Octobre 1986 & JP,A,61 114150 (JEOL LTD.) 31 Mai 1986, voir abrégé --- -/--	1,2,6

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 Mars 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

3. 04. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (- 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Horak, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10 no. 358 (P-522) [2415] ,2 Décembre 1986 & JP,A,61 155943 (JEOL LTD.) 15 Juillet 1986, voir abrégé ---	1,10,14
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11 no. 58 (P-550) [2505] ,21 Février 1987 & JP,A,61 223639 (JEOL LTD.) 4 Octobre 1986, voir abrégé ---	1,14
A	ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 41, no. 3, 1 Mars 1969 COLUMBUS US, pages 538-540, G.A. WARD ET AL. 'APPLICATION OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE TO QUANTITATIVE ANALYSIS OF MIXTURES OF ORGANIC PEROXIDES, HYDROPEROXIDES, AND ALCOHOLS' voir le document en entier -----	1,14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Convention Internationale No
PCT/FR 95/01650

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
GB-A-2135059	22-08-84	JP-A- 59136643	06-08-84
		JP-A- 60010160	19-01-85
		DE-A- 3402303	26-07-84

FR-A-2517828	10-06-83	EP-A,B 0090901	12-10-83
		JP-C- 1709393	11-11-92
		JP-B- 3079661	19-12-91
		JP-A- 58154646	14-09-83
		US-A- 4550082	29-10-85
